

バフィロマイシンA₁によるヒト膵癌細胞株の増殖抑制効果に関する実験的研究

金沢大学医学部医学科外科学第二講座 (主任：三輪晃一教授)

荒 川 元

液胞型プロトンポンプの特異的阻害剤であるバフィロマイシンA₁は種々の培養細胞に対して濃度依存性にその増殖を抑制することが知られている。しかし、その増殖抑制機序に関しては明らかではない。さらに、バフィロマイシンA₁の固形癌の増殖能に及ぼす影響について研究した報告も見られない。そこで、本研究はバフィロマイシンA₁が生物学的悪性度の極めて高い膵癌細胞の増殖を抑制し得るか否かを研究した。使用したヒト膵癌細胞株はCapan-1 (高分化型腺癌)、BxPC-3 (中分化型腺癌)、AsPC-1 (中分化型腺癌)、Panc-1 (低分化型腺癌) 及びMIAPaCa-2 (未分化癌) の5種類である。バフィロマイシンA₁の腫瘍増殖抑制効果に関しては、生体外での3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] アッセイ法と生体内でのヌードマウス皮下移植モデルで検討した。また、アポトーシスの診断は形態学的ならびにDNAの断片化の有無で行った。まず、バフィロマイシンA₁の各膵癌細胞株に対する72時間目でのIC₅₀値 (50%の増殖阻止を示すバフィロマイシンA₁濃度) はCapan-1で5 nM, AsPC-1で5 nM, BxPC-3で10 nM, Panc-1で30 nM, MIAPaCa-2で40 nMであった。そこで、バフィロマイシンA₁に感受性の高かったCapan-1を用いて、アポトーシス誘導の有無を検索した。まずDNAの解析では、バフィロマイシンA₁処理24時間目でその濃度が10 nM以上でDNAラダー像が観察された。また、ヌードマウスを用いた実験でも、背部に移植したCapan-1細胞に対してバフィロマイシンA₁ 1 mg/kg/日投与群ではコントロール群に比し21日目以降で有意に腫瘍の増殖が抑制され、病理組織学的には癌細胞の縮小や核の濃縮などアポトーシスに特徴的な所見が観察された。以上の所見より、バフィロマイシンA₁はアポトーシス誘導により膵癌細胞の増殖を抑制することが示唆された。

Key words apoptosis, bafilomycin A₁, pancreatic cancer, vacuolar type H⁺-ATPase

液胞型プロトンポンプ (vacuolar type H⁺-ATPase, V-ATPase) はミトコンドリアに存在するF型プロトンポンプ (F₁F₀-ATPase) や胃の壁細胞に存在するP型プロトンポンプ (H⁺-K⁺-ATPase, P-ATPase) に次ぐ第3のプロトンポンプとして近年見出されたもので、ライソゾーム、エンドソームなどの細胞内膜系に広く分布し、各オルガネラの微小環境を酸性に保つ役割を担っている^{1)~3)}。近年、このプロトンポンプが細胞内膜系にだけでなく、癌細胞や破骨細胞の細胞膜にも強く発現し、細胞外にプロトン (H⁺) を排出していることが報告されている^{4)~6)}。Ohtaら⁷⁾もヒト膵癌組織内で、液胞型プロトンポンプが正常膵組織に比べ過剰に発現していることを報告し、この液胞型プロトンポンプはプロトンの移動を通して膵癌細胞が円滑に増殖、浸潤していくのに至適な環境作りをしている可能性を指摘している。ところで、液胞型プロトンポンプの特異的阻害剤であるバフィロマイシンA₁ (bafilomycin A₁) は、*Streptomyces griseus* から分離された16員環マクロライド系抗生物質である⁸⁾。このバフィロマイシンA₁は、nMレベルの濃度で種々の培養細胞に対して濃度

依存性にその増殖を抑制することが知られている^{9)~11)}。しかも、バフィロマイシンA₁に対する感受性は正常細胞よりもトランスフォーメーションした細胞ほど高いことが報告されており¹²⁾、正常細胞と癌細胞とのバフィロマイシンA₁に対する感受性の差は癌治療の標的になりうると思われる。しかし、その増殖抑制の詳細な機序に関してはいまだ十分に解明されていない。さらに、これまでにバフィロマイシンA₁の固形癌の増殖能に及ぼす影響について研究した報告もない。

そこで本研究では、固型癌のなかでもきわめて生物学的悪性度が高いことで知られている膵癌の細胞株を用いて、バフィロマイシンA₁による膵癌の増殖抑制効果とアポトーシス誘導の有無について実験を行った。

材料および方法

I. ヒト膵癌培養細胞

分化度の異なるヒト膵癌細胞株を米国標準株機関 (American Type Culture Collection, ATCC) (Rockville, USA) より購入して

平成11年5月19日受付、平成11年7月7日受理

Abbreviations : DMSO, dimethyl sulfoxide; IC₅₀, the concentration of bafilomycin A₁ required for 50% inhibition of cell viability; ICE, interleukin-1β converting enzyme; MTT, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; PI, propidium iodide; TdT, terminal deoxynucleotidyl transferase, TUNEL, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling

使用した。使用した腫瘍細胞株は、Capan-1 (高分化型腺癌)、BxPC-3 (中分化型腺癌)、AsPC-1 (中分化型腺癌)、Panc-1 (低分化型腺癌)、MIAPaCa-2 (未分化癌) の5種類である。これら5種類の腫瘍細胞株は、いずれも液胞型プロトンポンプを過剰に発現している細胞株である¹¹⁾。細胞株の培養には、10%非働化牛胎児血清 (Gibco, Grand Island, USA) と0.3 mg/ml グルタミン (日水製薬, 東京) を含む RPMI-1640 培地 (日水製薬) を用い、5% CO₂ 濃度、37℃の条件下で培養した。

II. 実験動物

4週齢の雌ヌードマウス (BALB/C nu/nu) (日本クレア, 東京) を購入し2週間の予備飼育後、6週齢の時点で実験に供した。マウスの飼育は金沢大学医学部附属動物実験施設のアイソラック内で行い、滅菌水とオリエンタル固形飼料を自由に与えた。

III. 使用薬剤

液胞型プロトンポンプの特異的阻害剤であるバフィロマイシン A₁ は和光純薬工業 (大阪) から購入して使用した。実験に際して、本薬剤をまずジメチルスルフォキシド (dimethylsulphoxide, DMSO) (和光純薬) で溶解し、その後DMSOの最終濃度が1%以下になるように細胞培養液で希釈して使用した。

IV. 細胞活性度測定

分化度の異なる5種類のヒト腫瘍培養細胞株に対するバフィロマイシン A₁ の増殖能に及ぼす影響を3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムブロマイド [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide, MTT] 試薬 (Sigma, St Louis, USA) を用いて、種々のバフィロマイシン A₁ 濃度に対する培養細胞の細胞活性度 (cell viability) を測定することで評価した。具体的には、コンフレント状態にある5種類の腫瘍細胞株を0.02% EDTA添加0.25%トリプシン (Gibco) にて剥離し、PBS洗浄後、各腫瘍細胞株を前述の培養液に浮遊させて3×10⁴個/mlに調製し、96穴プレート (岩城硝子株式会社, 千葉) の各穴に180 μlずつ分注した。最終バフィロマイシン A₁ 濃度が1 nM, 5 nM, 10 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nM および100 nMになるように調製した培養液を各々20 μl分注し、計200 μlとして培養機中で静置した。24時間、48時間、72時間培養後、PBSに溶解した4 mg/ml MTTを各ウェルに20 μl加え、3時間培養した後に上清を吸引しDMSO 150 μlを加えホルムアザン結晶を溶解した。10分間攪拌した後に、540 nmにおける吸光度 OD₅₄₀ を測定した。OD₅₄₀ 値は自動吸光計 (EAR 340 AT, SLT, Vienna, Austria) を用いて測定し、測定値は3回の実験の平均および標準偏差をとった。バフィロマイシン A₁ 非処理群の吸光度に対するバフィロマイシン A₁ 処理群の吸光度の割合、すなわち、コントロールに対する生細胞の割合を求め、これを腫瘍細胞生存率 (% of control) とした。また、腫瘍細胞生存率 (% of control) より、50%増殖阻害濃度 (the concentration of bafilomycin A₁ required for 50% inhibition of cell viability, IC₅₀) 値を求め薬剤感受性の指標とした。

V. バフィロマイシン A₁ による Capan-1 細胞のアポトーシス誘導の有無について

バフィロマイシン A₁ の増殖抑制効果がアポトーシスに起因するものなのか否かについて、Capan-1細胞を用いて生化学的解析、細胞周期の解析ならびに形態学的解析を行って検討した。

1. 生化学的解析法

アポトーシスを検出する生化学的方法として、DNAのヌク

レオソーム単位での断片化 (DNA fragmentation) をアガロースゲル電気泳動で検出する方法¹²⁻¹⁴⁾を用いた。コンフレント状態のCapan-1細胞を培養液中に浮遊させて1.6×10⁶個/mlに調製し、バフィロマイシン A₁ 濃度を1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μM および10 μMに調製した培養液を加え、培養機内に静置した。24時間培養後、Capan-1細胞のDNAをセパジーンキット (三光純薬, 東京) を用いて抽出後、2.0%アガロースゲルにて電気泳動し、断片化したDNAを臭化エチジウム (ethidium bromide) で染色後、ヌクレオゾームレベルでの切断を示すDNAラダーの有無を検討した。

2. 細胞周期解析法

フローサイトメトリー法にて細胞のDNA含量を測定^{15,16)}し、アポトーシスに陥った細胞の割合を算出した。具体的には、コンフレント状態のCapan-1細胞を0.02% EDTA添加0.25%トリプシンにて剥離し、PBS洗浄後、培養液に浮遊させて1.6×10⁶個/mlに調製して培養機中に静置した。24時間培養後に、上清を注意深く吸引し、10 nMバフィロマイシン A₁ を含む培養液を加え培養機中で静置した。そして6時間、12時間、24時間および36時間後に、0.02% EDTA添加0.25%トリプシンにてCapan-1細胞を剥離し、PBSで洗浄、4℃で遠心 (1000 rpm, 5分間) 後、上清を取り除き、冷70%エタノールを加え細胞を懸濁し、4℃で4時間以上固定した。次に遠心 (1500 rpm, 5分間) し、上清を取り除きPBSで洗浄後、10 mg/ml RNase A溶液を10 μl, 1 mg/ml ヨウ化プロジウム (propidium iodide, PI) 溶液を1 ml加えて、37.5℃, 20分間遮光し染色した。また、コントロールとしてバフィロマイシン A₁ 無添加のCapan-1細胞も同様にPI染色し、EPICS PROFILEフローサイトメーター (flow cytometer) (Coulter Corporation, Miami, USA) を用いてDNA含量を測定しアポトーシス期 (sub G₀/G₁ phase) の増加について解析した。

3. 形態学的解析法

コンフレント状態のCapan-1細胞を0.02% EDTA添加0.25%トリプシンにて剥離しPBS洗浄後、培養液に浮遊させて1.6×10⁶個/mlに調製し、10 nMバフィロマイシン A₁ 濃度を含む培養液中に混入させ、培養機中で静置した。0.02% EDTA添加0.25%トリプシンにてCapan-1細胞を剥離し、PBSにて2回洗浄後、サイトスピン (Cytospi II) (Shandon southern product Ltd., Cheshire, England) を用いて95%のエタノールで固定後にHE染色し、形態学的に観察した。

VI. ヌードマウス皮下移植 Capan-1 細胞の増殖能に及ぼすバフィロマイシン A₁ の影響について

対数増殖期にあるCapan-1細胞を0.02% EDTA添加0.25%トリプシンにて剥離し遠心回収後、PBSにて2×10⁶個/mlに調整した。この際、トリパンブルー色素排除試験にて生細胞が95%以上であることを確認した。6週齢のヌードマウスに2グレイ (2 Gy) の全身照射を行った後に26G注射針にて2×10⁶個/mlのCapan-1細胞懸濁液0.5mlを20匹のヌードマウスの背部皮下に注入して移植した。そして、移植10日目に移植腫瘍の推定体積がおおよそ50 mm³であるヌードマウスを15匹選別し、この15匹を無差別にバフィロマイシン A₁ 0.1 mg/kg 負荷群 (n=5)、バフィロマイシン A₁ 1 mg/kg 負荷群 (n=5)、バフィロマイシン A₁ 非投与群 (n=5) の3群に分けた。生体内の実験では、バフィロマイシン A₁ を少量のエタノールで溶解し、その後さらにPBSにて希釈して使用した。皮下注射は背部の皮下腫瘍から離れた部位を選び、一日一回行った。また、バフィロマイシン

A₁非投与群には同量のエタノールを含むPBS溶液を皮下注射した。バフィロマイシンA₁投与期間中、皮下の腫瘍を電気ノギスで測定し、推定腫瘍体積をGrenら¹⁰⁾の方法を用いて(長径mm)×(短径mm)²×0.5(mm³)で算出した。また、同時にマウスの体重測定も行った。

Ⅵ. ノードマウス移植腫瘍の病理組織学的検索

バフィロマイシンA₁治療4週後に屠殺し、移植腫瘍ならびにノードマウスの肝、脾および腎組織を摘出し、10%のホルマリンで固定後にパラフィン包埋、HE染色を行って病理組織学的検索に供した。とくに移植腫瘍の検索には、各腫瘍につき3枚の代表切片を用いて評価した。

通常のHE染色でのアポトーシス細胞の診断基準は、細胞の縮小および核の濃縮や断片化が認められる細胞¹⁰⁾とした。そして、移植腫瘍組織内におけるアポトーシス細胞の割合が5%以下を(-)、5%から25%を(+), 25%から50%を(++), そして50%以上を(+++)の4段階に便宜上区分し、バフィロマイシンA₁の抗腫瘍効果を判定した。

さらに、腫瘍組織内のアポトーシス細胞の判定には、ターミナル・デオキシヌクレオチジル・トランスフェラーゼ (terminal deoxynucleotidyl transferase, TdT) 触媒デオチン-dUTPニック末端標識 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling, TUNEL) 法¹⁰⁾による検索も同時に行った。すなわち、薄切標本を脱パラフィンし親水後、2%過酸化水素水を加メタノール液に室温で20分間反応させ内因性ペルオキシダーゼをブロックした。流水にて水洗しPBSに室温で3分間浸した。20 mg/mlプロテナーゼK (Proteinase K) (Sigma) にて除蛋白後、流水にて水洗し、TdT緩衝液 [100mM カコジル酸カリウム, 2 mM 塩化コバルト (CoCl₂), 0.2 mM DTT, pH 7.2] に3分間浸した。次いで、TdT緩衝液に0.3 U/ml TdT (Oncor, Gaithersburg, USA) と0.04 nm/ml ビオチン標識dUTP (Oncor) を加えたTdT反応液を適量滴下し、各組織片にカバーガラスをかけ37℃の加湿器で60分間反応させた。次に緩衝液 (0.3 M 塩化ナトリウム, 30 mM クエン酸ナトリウム) に30分間浸してTdT反応を停止した。PBSで洗浄し、ペルオキシダーゼ標識抗ジゴキシゲニン抗体 (Oncor) と30分間反応させた。PBSで洗浄の後、過酸化水素水を添加した3, 3'-ジアミノベンチジンで発色し、メチルグリーンで核染色を行った。TdT処理前にカコジル酸ナトリウム緩衝液 (pH 7.2) に溶解した1 mg/ml DNase 1 (Sigma) 溶液で10分間処理した組織切片を陽性コントロールとして、TdTを含まずにTdT緩衝液のみで処理した組織切片を陰性コントロールとして用いた。

Ⅶ. 統計学的検定法

測定値はすべて平均±標準偏差 ($\bar{x} \pm SD$) で示した。2群間の比較にはまずF検定による等分散の検定を行い、分散が等しい場合にはStudentのt検定を、等しくない場合はWeichのt検定を用い、危険率5%未満 ($p < 0.05$) をもって統計的に有意差ありと判定した。

成 績

I. 生体外での膵癌培養細胞の増殖能に及ぼすバフィロマイシンA₁の影響について

分化度の異なる5種類のヒト膵癌細胞株に対するバフィロマイシンA₁の増殖能に及ぼす影響を、MTTアッセイ法による細胞

活性度 (cell viability) を測定して評価した。すなわち、各細胞株を1 nM, 5 nM, 10 nM, 30 nM, 40 nM, 50 nMおよび100 nMのバフィロマイシンA₁の濃度で処理し、処理後24時間目、48時間目および72時間目の細胞活性度を測定した。その結果、5種類すべての膵癌細胞株の細胞活性度はコントロールに比べ濃度依存性に抑制された (図1-5)。各膵癌細胞株の72時間目でのIC₅₀値はCapan-1細胞 (高分化型腺癌) で5 nM, AsPC-1細胞 (中分化腺癌) で5 nM, BxPC-3細胞 (中分化腺癌) で10 nM, Panc-1細胞 (低分化腺癌) で30 nM, MIAPaCa-2細胞 (未分化腺癌) で40 nMであった。そこで、10 nMの低濃度バフィロマイシンA₁に対する各膵癌細胞株の感受性をみたところ、分化型であるCapan-1細胞, AsPC-1細胞およびBxPC-3細胞では非常に感受

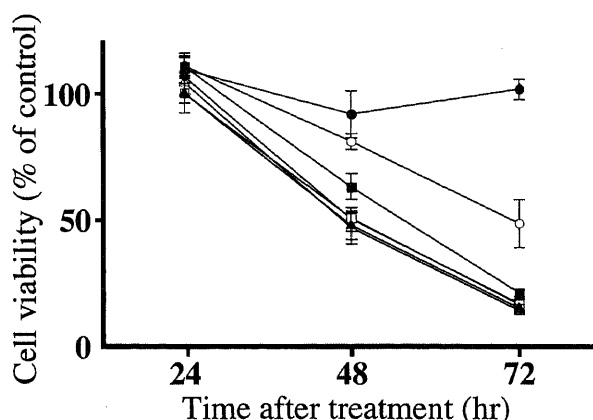


Fig. 1. Effect of bafilomycin A₁ on cell viability of pancreatic cancer cell line, Capan-1. Capan-1 cells were treated for 72hr with bafilomycin A₁ at a concentration of 1 ●, 5 ○, 10 ■, 30 □, 40 ▲, 50 △ and 100 nM ◆. Points, the $\bar{x} \pm SD$ of triplicate observations from three separate experiments. The IC₅₀ value (the concentration of bafilomycin A₁ required for 50% inhibition of cell viability) of Capan-1 during 72hr was 5 nM.

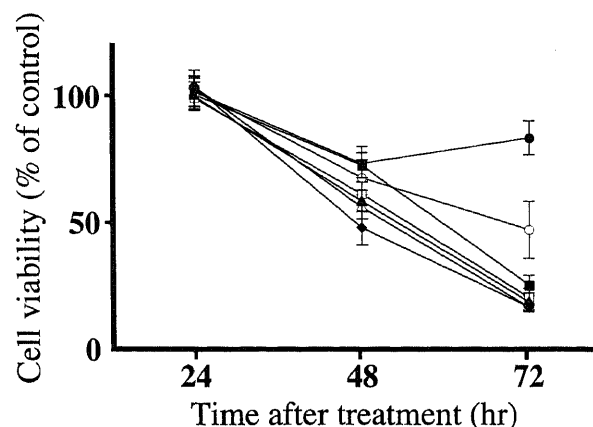


Fig. 2. Effect of bafilomycin A₁ on cell viability of pancreatic cancer cell line, AsPC-1. AsPC-1 cells were treated for 72hr with bafilomycin A₁ at a concentration of 1 ●, 5 ○, 10 ■, 30 □, 40 ▲, 50 △ and 100 nM ◆. Points, the $\bar{x} \pm SD$ of triplicate observations from three separate experiments. The IC₅₀ value of AsPC-1 during 72hr was 5 nM.

Table 1. The change of the proportion of apoptotic cells following bafilomycin A₁ treatment in Capan-1 cells

Time (hr)	0	6	12	24	36
Bafilomycin A ₁ treated cells (10 nM)	2.2±0.2%	2.4±0.3%	8.2±0.7%	22.8±1.9%	38.9±1.9%
Vehicle-treated control cells	2.3±0.2%	2.2±0.1%	2.5±0.2%	4.8±0.5%	5.7±0.2%
p-value	NS	NS	p<0.01	p<0.01	p<0.01

These data are expressed as the $\bar{x} \pm \text{SD}$ of two different experiments in triplicate. NS, not significant.

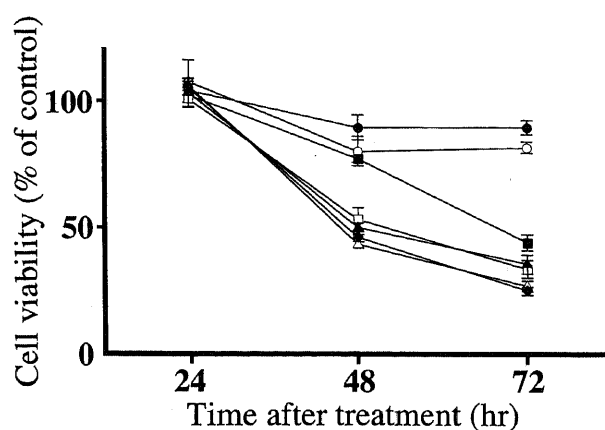


Fig. 3. Effect of bafilomycin A₁ on cell viability of pancreatic cancer cell line, BxPC-3. BxPC-3 cells were treated for 72hr with bafilomycin A₁ at a concentration of 1 ●, 5 ○, 10 ■, 30 □, 40 ▲, 50 △ and 100 nM ◆. Points, the $\bar{x} \pm \text{SD}$ of triplicate observations from three separate experiments. The IC₅₀ value of BxPC-3 during 72hr was 10 nM.

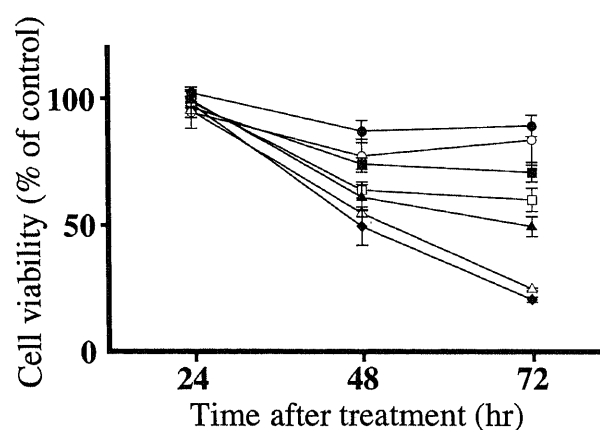


Fig. 5. Effect of bafilomycin A₁ on cell viability of pancreatic cancer cell lines, MIA PaCa-2. MIA PaCa-2 cells were treated for 72hr with bafilomycin A₁ at a concentration of 1 ●, 5 ○, 10 ■, 30 □, 40 ▲, 50 △ and 100 nM ◆. Points, the $\bar{x} \pm \text{SD}$ of triplicate observations from three separate experiments. The IC₅₀ value of MIA PaCa-2 during 72hr was 40 nM.

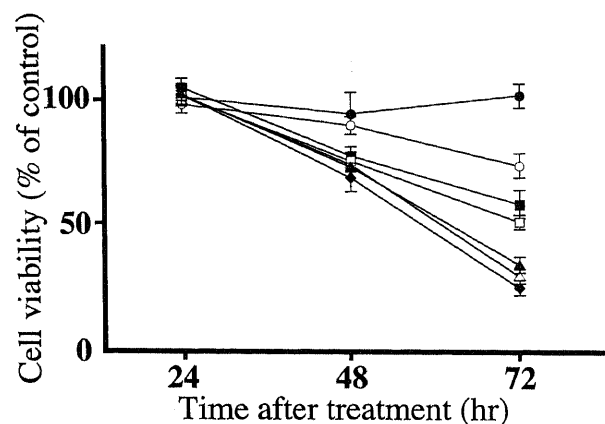


Fig. 4. Effect of bafilomycin A₁ on cell viability of pancreatic cancer cell lines, Panc-1. Panc-1 cells were treated for 72hr with bafilomycin A₁ at a concentration of 1 ●, 5 ○, 10 ■, 30 □, 40 ▲, 50 △ and 100 nM ◆. Points, the $\bar{x} \pm \text{SD}$ of triplicate observations from three separate experiments. The IC₅₀ value of Panc-1 during 72hr was 30 nM.

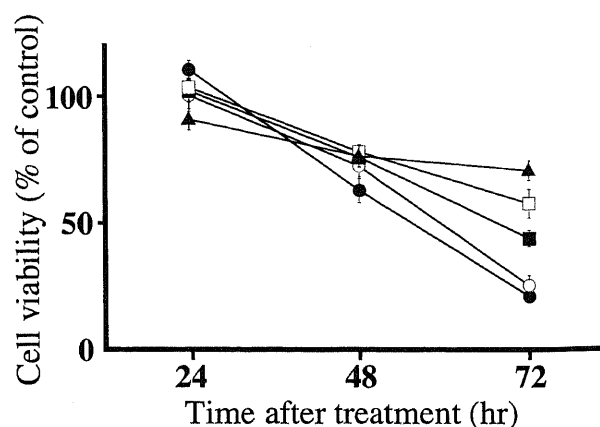


Fig. 6. Effect of 10nM bafilomycin A₁ on viability of cell lines. The plot symbols: Capan-1 ●, AsPC-1 ○, BxPC-3 ■, Panc-1 □, MIA PaCa-2 ▲. Each data point represents $\bar{x} \pm \text{SD}$ of three different experiment performed in triplicate.

性が高かった。これに対し、分化度の低いPanc-1細胞およびMIAPaCa-2細胞では感受性が低く、なかでも未分化型のMIAPaCa-2ではほとんど細胞活性度に影響を与えなかった(図6)。

II. バフィロマイシンA₁によるCapan-1細胞のアポトーシス誘導について

今回の研究で使用した5種類の膵癌細胞株のうち、バフィロマイシンA₁に感受性の高かったCapan-1細胞を用いて、バフィロマイシンA₁による増殖抑制効果がアポトーシスに起因するものなのか否かを生化学的解析、細胞周期の解析ならびに形態学

的解析を行って検討した。なお、このCapan-1細胞株は、きわめてヒトの膵癌に類似した発育を呈するムチン産生の分化型腺癌であることで知られている²⁰⁾。

1. 生化学的解析

バフィロマイシンA₁濃度が10 nM以上では、およそ180 bp単位でDNAが分断されており、いわゆるアポトーシスの特徴的所見であるDNAラダー像(DNA ladder pattern)が観察された(図7)。

2. 細胞周期の解析

10 nMバフィロマイシンA₁で処理したCapan-1細胞の細胞周

Table 2. Effect of bafilomycin A₁ on the xenografted Capan-1 cell tumors in nude mice

Treatment group	Final tumor volume (mm ³)	Body weight (mg)	
		Pre-treatment	Post-treatment
Control	580.9±90.0	19.2±0.8	20.4±1.6
Bafilomycin A ₁ (0.1 mg/kg)	478.4±172.2	18.7±1.0	19.4±2.4
Bafilomycin A ₁ (1.0 mg/kg)	330.9±86.1*	18.7±0.7	19.7±0.6

Nude mice with implanted tumors received injection of bafilomycin A₁ or control buffer for 4 weeks. These data are expressed as the mean from five animals ±SD. *p<0.05 vs control

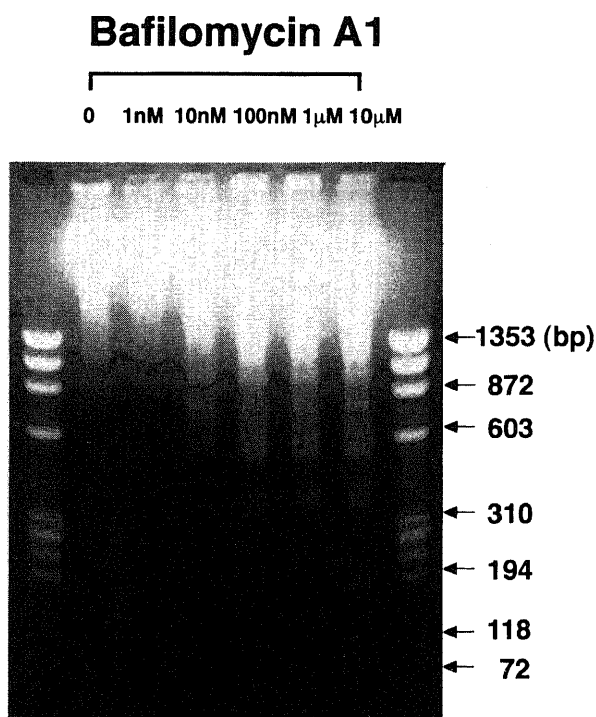


Fig. 7. DNA fragmentation analysis of Capan-1 cells after incubation for 24 hr with various concentrations of bafilomycin A₁. The pooled floating and adherent cells were collected. The DNA were electrophoresed in a 2% agarose gel. The appearance of the ladder of DNA fragments was observed at bafilomycin A₁ concentrations greater than 10 nM.

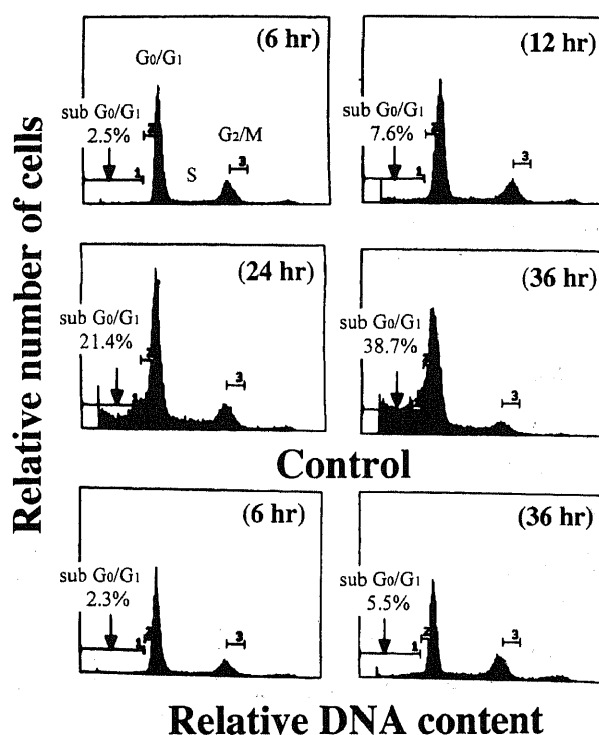


Fig. 8. Effect of bafilomycin A₁ on the cell cycle distribution of Capan-1 cells. Capan-1 cells were treated with bafilomycin A₁ (10nM) as indicated, stained with propidium iodide, and their DNA content was analyzed by flow cytometry. The position of the sub G₀/G₁ peak, integrated by apoptotic cells, is indicated by arrows.

期の分布を経時的にフローサイトメーターを用いて観察した。その結果、バフィロマイシン A_1 処理細胞で非処理のコントロール細胞と比較し、12時間目以降でアポトーシスを示すサブ G_0/G_1 分画が有意に増加し、36時間目で平均 38.9%の細胞がア

ポトーシスに陥っていた(図8, 表1)。

3. 形態学的観察

10 nMのバフィロマイシン A_1 で48時間処理したCapan-1細胞をサイトスピン法を用いてHE染色を行ったところ、図9に示

Table 3. The quantitative assay for apoptosis in the xenografted Capan-1 cell tumors

Proportion of apoptotic cell in tumors	(-)	(+)	(++)	(+++)
Control group (n=5)	5	0	0	0
Low-dose bafilomycin A_1 treated group (n=5)	0	4 (80)	1 (20)	0
High-dose bafilomycin A_1 treated group (n=5)	0	0	1 (20)	4 (80)

The proportion of apoptotic cells was graded as follows: (-), less than 5% of tumor cells; (+), 5-25% of tumor cells; (++) , 25-50% of tumor cells; (+++) , more than 50 % of cells. Data are expressed as number of animals (%).

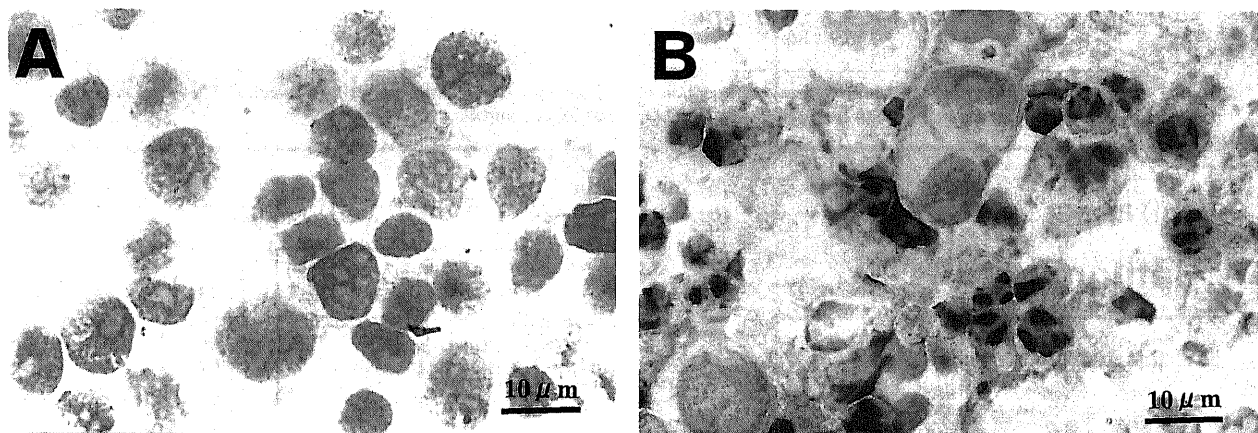


Fig. 9. Effect of bafilomycin A_1 on the morphology of Capan-1 cells. (A) Control cells (HE staining), (B) Cells following treatment with 10 nM bafilomycin A_1 for 2 days (HE staining).

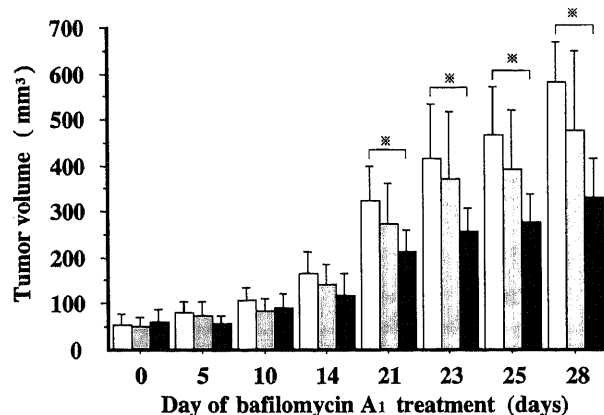


Fig. 10. Growth of implanted Capan-1 cell tumors in nude mice during the various doses of bafilomycin A_1 . Chronic treatment with high-dose bafilomycin A_1 [1.0 mg/kg (■)] significantly inhibited tumor growth as compared with that controls (□) after 21 days. (▨), bafilomycin A_1 (0.1 mg/kg). * $p < 0.05$.

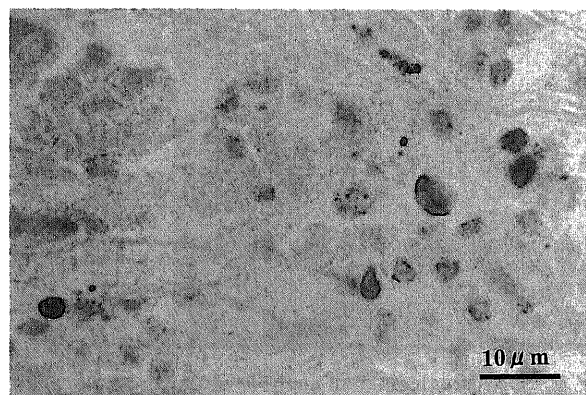


Fig. 12. Detection of apoptosis in treatment with bafilomycin A_1 (1.0 mg/kg/day) produced tumor cells. Apoptotic cells are stained by the terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end-labeling (TUNEL) method.

すようにCapan-1細胞の細胞質の萎縮、核の濃染ならびに核の分断化が観察され、アポトーシスに矛盾しない所見であった。

Ⅲ. ノードマウス皮下移植Capan-1細胞の増殖能に及ぼすバフィロマイシンA₁の影響について

バフィロマイシンA₁に感受性の高かったCapan-1細胞をノードマウスの皮下に移植し、移植腫瘍の推定体積がおおよそ50 mm³になったころ(移植後10日目)から連日バフィロマイシンA₁を皮下注射して全身投与し、皮下腫瘍の増殖抑制効果の有無を観察した。その結果、図10に示すようにバフィロマイシンA₁ 1 mg/kg 負荷群ではコントロール群に比べ21日目以降で有

意に腫瘍の増殖が抑制された ($p < 0.05$)。この間体重の推移に関しては両群間に有意の差はみられなかった(表2)。

Ⅳ. ノードマウス移植腫瘍の病理組織学的検索

移植腫瘍の病理組織学的検索では、バフィロマイシンA₁非投与のコントロール群で高分化型の管状腺癌が観察された(図11A-C)。これに対し、バフィロマイシンA₁ 1 mg/kg 負荷群では半数以上の癌細胞に核の濃染および細胞質の萎縮が観察され、典型的なアポトーシスの所見を呈していた(図11D-F)。これら核の濃染および細胞質の萎縮を呈した癌細胞は、TUNEL法で染色しても核が淡い茶色に可染され、間違いなくアポトー

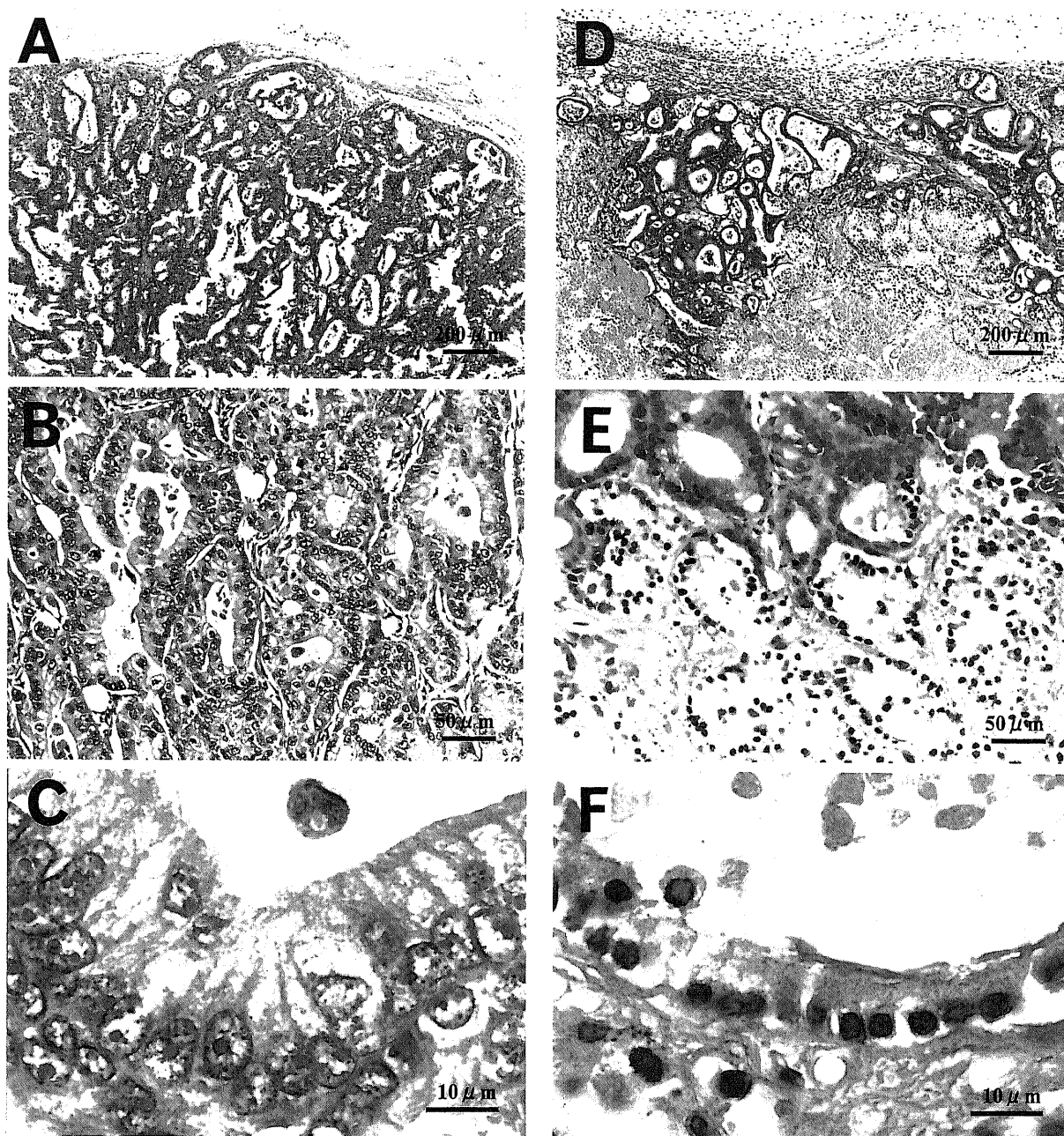


Fig. 11. Histopathologic examination of the tumors. (A, B, C) Xenografted Capan-1 cell tumors in control group exhibited characteristics of a well-differentiated tubular adenocarcinoma; (D, E, F) chronic treatment with bafilomycin A₁ (1.0 mg/kg/day) produced tumor cells with signs of apoptosis including cell shrinkage and chromatin condensation to the periphery of nuclear membrane. (HE staining)

シスに陥っていた細胞であることが確認された(図12)。表3には、それぞれの群における移植腫瘍組織内でのアポトーシス細胞の割合を示した。バフィロマイシンA₁ 1 mg/kg 負荷群では、5個中4個(80%)の腫瘍で半数以上の癌細胞がアポトーシスに陥っていたが、0.1 mg/kg 負荷群ではいずれの腫瘍もアポトーシスに陥ってる癌細胞の割合は少なかった。

また、バフィロマイシンA₁治療4週後に犠牲死させたヌードマウスの肝、脾および腎組織を病理組織学的に検索したが、いずれの群においても病理組織学的に異常な所見は認められなかった。

考 察

アポトーシス(apoptosis)という細胞死の概念は、約25年前に英国の病理学者であるKerrら¹⁸⁾によって提唱されたものであり、ネクローシスとは明らかに区別されるべき能動的な細胞死²¹⁾として最近注目を集めている。アポトーシスを起した細胞では、細胞の縮小や核膜周辺へのクロマチン凝縮などの形態学的特徴²¹⁾²²⁾のほか、DNAの断片化といった生化学的变化がみられ²³⁾、生体内にあっては比較的すみやかに排除されることが知られている²⁴⁾²⁵⁾。しかし、最近になり抗癌剤による癌細胞の死滅はアポトーシスというプログラムが関与していることが次第にわかってきた²⁶⁾²⁷⁾。そして、現在のところアポトーシスの誘導に関する細胞内の遺伝子としてp53²⁸⁾、インターロイキン-1β転換酵素(interleukin-1β converting enzyme, ICE)²⁹⁾、Bax³⁰⁾などが、さらにアポトーシスの抑制に関与する遺伝子としてBcl-2³¹⁾³²⁾やBcl-xL³³⁾などが知られるようになってきた。

ところで、もし癌細胞に効率よくアポトーシスを誘導して消滅させることができる薬剤があれば、それは理想的な抗癌剤となる可能性がある。しかしながら、現在のところ消化器癌のなかで最も悪性度が高いことで知られている膵癌にアポトーシスを効率よく誘導するような有効な抗癌剤がないのが実状である。そこで、本研究では進行膵癌が液胞型プロトンポンプを過剰に発現している³⁴⁾³⁵⁾ことに着目し、液胞型プロトンポンプの特異的阻害剤であるバフィロマイシンA₁がアポトーシスを介して膵癌の増殖を抑制することが可能か否かを研究した。まず最初に、分化度の異なる5種類のヒト膵癌細胞株に対するバフィロマイシンA₁の増殖能に及ぼす影響をMTTアッセイ法で検討した。その結果、5種類のすべての膵癌細胞株の細胞活性度はコントロール群に比べ濃度依存性に抑制され、バフィロマイシンA₁の72時間目でのIC₅₀値はCapan-1(高分化型腺癌)で5 nM、AsPC-1(中分化型腺癌)で5 nM、BxPC-3(中分化型腺癌)で10 nM、Panc-1(低分化型腺癌)で30 nM、MIAPaCa-2(未分化型腺癌)で40 nMと、いずれもnMレベルであり、バフィロマイシンA₁による膵癌細胞株の著明な増殖抑制効果が認められた。しかも分化型の膵癌細胞株の方が未分化型のものよりも細胞活性度が強く抑制されたことより、膵癌細胞のバフィロマイシンA₁に対する感受性は癌細胞の分化度と強い相関があることが示唆された。そこで、次にバフィロマイシンA₁に感受性の高かったCapan-1細胞を用いて、アポトーシス誘導の有無を検索した。まず、生体外でのDNAの解析では、バフィロマイシンA₁処理24時間目で、その濃度が10nM以上でDNAラダー像が確認された。さらに、ヌードマウスを用いた生体内の実験でも、背部に移植したCapan-1細胞に対してバフィロマイシンA₁ 1 mg/kg 投与群ではコントロール群に比べ21日目以降で有意に腫瘍の

増殖が抑制され、病理組織学的には癌細胞の縮小や核の濃縮などアポトーシスに特徴的な所見が観察された。以上の成績より、バフィロマイシンA₁はアポトーシスを介して膵癌細胞の増殖を抑制することが示唆された。最近、Nishiharaら³⁶⁾は、バフィロマイシンA₁がアポトーシスによりBリンパ腫細胞株(WEHI 231細胞)の生体外での増殖を抑制したことを報告しているが、固形癌に対するバフィロマイシンA₁の生体内での増殖能に及ぼす影響を研究した報告はこれまでにない。したがって、本研究は固形癌(ヌードマウス皮下移植ヒト膵癌)に対してバフィロマイシンA₁の抗腫瘍効果を観察した内外で最初の報告である。このほか、本研究では、バフィロマイシンA₁治療4週後に犠牲死させたヌードマウスの肝、脾および腎組織を病理組織学的に検討し、いずれの群においても病理組織学的に異常所見なく、また体重の推移にも有意差のないことが確認された。とくに、液胞型プロトンポンプに富む多くのライソゾーム顆粒を有している正常肝細胞に形態学的な変化をもたらさなかったことが注目される。この結果は、マウスの正常肝細胞とCapan-1細胞とではバフィロマイシンA₁に対する感受性が違うことを示唆しており、バフィロマイシンA₁に対する感受性は正常肝細胞よりもトランスフォーメーションした細胞ほど高いことを指摘しているManabeら¹⁹⁾の報告と一致するものであった。さらに、本研究では同じ膵癌細胞でも分化型の膵癌細胞株の方が未分化型よりもバフィロマイシンA₁に対する感受性が高いとの結果が得られた。したがって、正常細胞と癌細胞におけるバフィロマイシンA₁に対する感受性の差は、十分癌治療の標的になりうる可能性を示唆するものである。さらに、ヒト膵癌組織の大部分は分化型であり³⁸⁾、未分化型がきわめて少ないことを考え合わせると、ヒト膵癌細胞質内に過剰発現している液胞型プロトンポンプを標的にしたバフィロマイシンA₁によるプロトンポンプインヒビター治療で膵癌の増殖をかなり特異的に抑えることが可能であると思われた。ただし本研究では、バフィロマイシンA₁が高価であるためヌードマウスに対するバフィロマイシンA₁の極量(maximum tolerated dose)の測定は行っておらず、また、バフィロマイシンA₁投与後の主要臓器の組織内濃度の測定もおこなっていない。これらの問題は、今後検討すべき課題と考えている。

最後に、どのような機序でバフィロマイシンA₁が膵癌細胞株に対してアポトーシスを誘導したのかを考察する。最近、エトポシド(etoposide)処理で誘導されたHL-60細胞株にみられるアポトーシスには、細胞質のpHの低下(cytosolic acidification)が先行して認められるとの報告がある³⁹⁾。しかし、一方ではバフィロマイシンA₁はラット由来PC-12細胞において、細胞質内pHとは無関係にアポトーシスを誘導することも知られている²⁰⁾。このように現時点ではまだバフィロマイシンA₁によって誘導されるアポトーシスの機序に関して、一定の見解が得られていないのが実状である。今後、バフィロマイシンA₁処理による細胞質内pHの推移や癌細胞内におけるアポトーシス関連遺伝子群(p53, ICE, Bax, Bcl-2など)の発現との関連に注目して研究していく必要があると考えている。

結 論

分化度の異なる5種類のヒト膵癌培養細胞株と液胞型プロトンポンプの特異的阻害剤であるバフィロマイシンA₁を用いて、膵癌の増殖抑制ならびにアポトーシスとの関係について検討

し、以下の結果を得た。

1. 液胞型プロトンポンプの特異的阻害剤であるバフィロマイシンA₁はnMでヒト膵癌細胞株の細胞活性度を抑制した。

2. また、そのヒト膵癌細胞株のバフィロマイシンA₁に対する感受性は分化度が高いヒト膵癌細胞株ほど高い傾向を示した。

3. ヒト膵癌細胞の増殖抑制の機序としてアポトーシスの関与が示唆された。

以上の所見より、バフィロマイシンA₁はアポトーシスを介して膵癌細胞の増殖を抑制することが示唆された。

謝 辞

稿を終えるに臨み、終始御懇篤なる御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部外科学第二講座三輪見一教授に深甚なる謝意を表します。本研究の遂行にあたり、直接御指導と御鞭撻を賜りました金沢大学医学部外科学第二講座太田哲生講師に深く感謝いたします。また、御助言、御協力を戴きました金沢大学薬学部生化学教室大熊勝治教授および外科学第二講座の諸兄に厚く御礼申し上げます。

尚、本研究の要旨は第97回日本外科学会総会(1997, 京都), The 4th Congress of Asian Society of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery (1997, Tokyo) において発表した。

文 献

- 1) Forgacs M. Structure and function of vacuolar class of ATP-driven proton pumps. *Physiol Rev* 69: 765-796, 1989
- 2) Nelson N. Structure, molecular genetics and evolution of vacuolar H⁺-ATPase. *J Bioenerg Biomembr* 21: 553-571, 1989
- 3) Moriyama Y, Futai H. H⁺-ATPase, a primary pump for accumulation of neurotransmitters, is a major constituent of brain synaptic vesicles. *Biochem Biophys Res Commun* 173: 443-448, 1990
- 4) Vaananen HK, Karhukorpi EK, Sundquist K, Wallmark B, Roininen I, Hentunen T, Tuukkanen J, Lammakorpi P. Evidence for the presence of a proton pump of vacuolar H⁺-ATPase type in the ruffled borders of osteoclasts. *J Cell Biol* 111: 1305-1311, 1990
- 5) Martinez-Zagulian R, Lynch RM, Martinez GM, Gillies RJ. Vacuolar-type H⁺-ATPase are functionally expressed in plasma membranes of human tumor cells. *Am J Physiol* 265: 1015-1029, 1993
- 6) Ohta T, Numata M, Yagishita H, Futagami F, Tsukioka Y, Kitagawa H, Kayahara M, Nagakawa T, Miyazaki I, Yamamoto M, Iseki S, Ohkuma S. Expression of 16kDa proteolipid of vacuolar-type H⁺-ATPase in human pancreatic cancer. *Br J Cancer* 73: 1151-1517, 1996
- 7) Bowmann EJ, Siebers A, Altendorf K. Bafilomycins: A class of inhibitors of membrane ATPases from microorganisms, animal cell, and plant cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 7972-7976, 1988
- 8) Nelson H, Nelson N. Disruption of genes encoding subunits of yeast vacuolar H⁺-ATPase causes conditional lethality. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 3503-3507, 1990
- 9) Ohkuma S, Shimizu S, Noto M, Sai Y, Kinoshita K, Tamura H. Inhibition of cell growth by bafilomycin A₁, a selective inhibitor of vacuolar H⁺-ATPase. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* 29A: 862-866, 1993
- 10) Manabe T, Yoshimori T, Henomatsu N, Tashiro Y. Inhibitors of vacuolar-type H⁺-ATPase suppress proliferation of cultured cells. *J Cell Physiol* 157: 445-452, 1993
- 11) 太田哲生, 中川原寿俊, 荒川 元, 二上文夫, 月岡雄二, 北川裕久, 萱原正都, 永川宅和, 宮崎逸夫. Protease inhibitor および proton pump inhibitor を用いた膵癌治療に対する制癌治療戦略. *日消外会誌* 29: 888-892, 1996
- 12) Cohen JJ. Overview: mechanism of apoptosis. *Immunol Today* 14: 126-130, 1993
- 13) Cohen JJ, Duke RC. Apoptosis and programmed cell death in immunity. *Annu Rev Immunol* 10: 267-293, 1992
- 14) Arends MJ, Wyllie AH. Apoptosis: mechanism and role in pathology. *Int Rev Exp Pathol* 32: 223-254, 1991
- 15) Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium staining and flow cytometry. *J Immunol Methods* 139: 271-279, 1991
- 16) Darzynkiewicz Z, Brunos S, Del Bino G, Gorczyca W, Hotz MA, Lassota P, Traganos F. Feature of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 13: 759-808, 1992
- 17) Gren RI, Greenberg NH, McDonald MM. Protocol for screening chemical agent and natural product against animal tumors and other biological system. *Cancer Chemother Rep* 3: 51-61, 1972
- 18) Kerr JFR, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis. A basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer* 26: 239-257, 1972
- 19) Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol* 119: 493-501, 1992
- 20) Kyriazis AP, Kyriazis AA, Scarpelli DG, Fogh J, Rao MS, Lepera R. Human pancreatic adenocarcinoma line capan-1 in tissue culture and nude mouse: morphologic, biologic, and biochemical characteristics. *Am J Pathol* 106: 250-260, 1982
- 21) Cohen JJ. Apoptosis. *Immunol Today* 14: 126-130, 1993
- 22) Golstein P, Ojcius DM, Young JD. Cell death mechanisms and the immune system. *Immunol Rev* 121: 29-65, 1991
- 23) Arends MJ, Morris RG, and Wyllie AH. Apoptosis. The role of the endonuclease. *Am J Pathol* 136: 593-601, 1990
- 24) Savill J, Fadok V, Henson P, Haslett C. Phagocyte recognition of cells undergoing apoptosis. *Immunol Today* 14: 131-136, 1993
- 25) Savill J, Smith J, Sarraf C, Ren Y, Abbott F, Rees A. Glomerular mesangial cells and inflammatory macrophages ingest neutrophils undergoing apoptosis. *Kidney Int* 42: 924-936, 1992
- 26) Walker PR, Smith C, Youdale T, Leblanc J, Whitfield JF, Sikorska M. Topoisomerase -II reactive chemotherapeutic drugs induce apoptosis in thymocytes. *Cancer Res* 51: 1078-1085, 1991
- 27) Tepper CG, Studzinsky GP. Teniposide induces nuclear but not mitochondrial DNA degradation. *Cancer Res* 52: 3384-3390, 1992
- 28) Yonish-Rouach E, Resnizky D, Lotem J, Sachs L, Kimchi A, Oren M. Wild-type p53 induces apoptosis of myeloid leukemic

- cells that is inhibited by interleukin-6. *Nature* 352: 345-347, 1991
- 29) Miura M, Zhu H, Rotello R, Hartwig EA, Yuan J. Induction of apoptosis in fibroblast by IL-1 beta-converting enzyme, a mammalian homolog of the *C.elegans* cell death gene *ced-3*. *Cell* 75: 653-660, 1993
- 30) Oltvai ZN, Millman CL, Korsmeyer SJ. Bcl-2 heterodimerizes in vivo with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell* 74: 609-619, 1993
- 31) Jacobson MD, Burne JF, King MP, Miyashita T, Reed JC, Raff MC. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature* 361: 365-369, 1993
- 32) Boise LH, Gonzalez-Garcia M, Postema CE, Ding L, Lindsten T, Tukka LA, Mao X, Nunez G, Thompson CB. *bcl-x*, a *bcl-2*-related gene that functions as a dominant regulator of apoptotic cell death. *Cell* 74: 597-608, 1993
- 33) Shimizu S, Eguchi Y, Kosaka H, Kamiike W, Matsuda H, Tsujimoto Y. Prevention of hypoxia-induced death by Bcl-2 and

Bcl-xL. *Nature* 374: 811-813, 1995

- 34) Nishihara T, Akifusa S, Koseki T, Kato S, Muro M, Hanada N. Specific inhibitors of vacuolar type H⁺-ATPase induce apoptotic cell death. *Biochem Biophys Res Commun* 212: 255-262, 1995
- 35) Günter Klöppel, Philipp U. Heitz. Pancreatic, non-endocrine tumours: Pancreatic Pathology, 1st ed, p79-113, Churchill Livingstone, Edinburgh London Melbourne and New York, 1984
- 36) Perez-Sala D, Collado-Escobar D, Mokkinedo F. Intracellular alkalization suppresses lovastatin-induced apoptosis in HL-60 cells through the inactivation of a pH-dependent endonuclease. *J Biol Chem* 270: 6235-6242, 1995
- 37) Kinoshita K, Waritani T, Noto M, Takizawa K, Minemoto Y, Nishikawa A, Ohkuma S. Bafilomycin A₁ induces apoptosis in PC 12 cells independently of intracellular pH. *FEBS Lett* 398: 61-66, 1996

Inhibitory Effect of Bafilomycin A₁ on Growth of Human Pancreatic Ductal Cancer Cell Lines Hajime Arakawa, Department of Surgery (II), School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — *J. Jusen Med Soc.*, **108**, 419 — 428 (1999)

Key words pancreatic ductal cancer, vacuolar type H⁺-ATPase, apoptosis, bafilomycin A₁

Abstract

Bafilomycin A₁, a specific inhibitor of vacuolar type H⁺-ATPase, is known to inhibit the growth of a variety of cultured cells in a dose dependent manner, but the exact mechanism is unclear. In addition, there is no report that has focused on the inhibitory effect of bafilomycin A₁ on the growth of human solid tumors. The aim of this study was to examine whether bafilomycin A₁ inhibits the cell growth of human pancreatic ductal cancers through apoptosis. Five human pancreatic ductal cancer cell lines were used, specifically Capan-1, AsPC-1, BxPC-3, Panc-1 and MIAPaCa-2. The effect of bafilomycin A₁ on tumor growth was examined both *in vitro* and *in vivo* using 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide assay and an *in vivo* tumor model. The presence or absence of apoptosis was determined by morphology and DNA analysis of the tumor cells. The concentrations of bafilomycin A₁ required to produce 50 % inhibition of the viability over a 72 hr MTT assay were 5 nM for Capan-1, 5 nM for AsPC-1, 10 nM for BxPC-3, 30 nM for Panc-1, and 40 nM for MIAPaCa-2, respectively. In the DNA analysis, a ladder of fragmented DNA was detected in Capan-1 cells treated with bafilomycin A₁ at concentrations greater than 10 nM for 24hr. Nude mice given a xenograft of Capan-1 cells received 4 weeks of bafilomycin A₁ (1.0 mg/kg/day). This treatment significantly inhibited tumor growth compared with tumor growth in the control mice after 21 days. Histologic examination of tumor cells in the treated group demonstrated signs of apoptosis, such as cell shrinkage and chromatin condensation. These findings suggest that bafilomycin A₁ inhibits tumor growth in human pancreatic ductal cancers through apoptosis.